

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Hormonelle Beeinflussung
der Alkalischen Leukozytenphosphatase
bei hypophysektomierten Ratten.

Inaugural - Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der
Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Rolf Schröder
aus Bad-Salzschlirf

Gießen 1974

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Problemstellung	3
3. Material und Methoden	3 - 8
a) Versuchstiere	4
b) Testsubstanzen	4
c) Cytochemischer Nachweis	5
d) Ermittlung der Enzymaktivität	7
4. Versuchsablauf	9
5. Statistik	10
6. Ergebnisse	12 - 20
a) Vorversuche	12
b) Verhalten der ALP nach Hypophysektomie	13
c) Kontrollgruppen	14
d) Applikation von Orgastiptin	15
e) Applikation von Östrogen	16
f) Applikation von Progesteron	17
g) Applikation von Testosteron	18
h) Applikation von Östrogen u. Actinomycin D	19
i) Verhalten der Leukozyten	20
7. Diskussion	21 - 25
8. Zusammenfassung	26
9. Statistische Ergebnisse	27 - 31
10. Tabellen	32 - 40
11. Literaturverzeichnis	41 - 46
12. Lebenslauf	47
13. Danksagung	48



Einleitung:

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in neutrophilen Granulocyten leistet bei der Differentialdiagnose verschiedener hämatologischer Erkrankungen wertvolle Dienste. Von Wachstein wurde 1964 zum ersten Mal eine Beziehung zwischen einer hämatologischen Erkrankung und der Phosphatase-Aktivität in neutrophilen Granulocyten beschrieben. Er fand, daß bei der chronischen myeloischen Leukämie die Phosphatase-Aktivität vermindert ist oder sogar fehlt.

Heute weiß man, daß die alkalische Leukocytenphosphatase (ALP) bei verschiedenen Krankheiten verändert sein kann.

Mehrere Autoren beschrieben geschlechtsabhängige Unterschiede der ALP-Aktivität. So ist bei geschlechtsreifen Frauen die Phosphatase-Aktivität höher als bei Männern (Baxter (68), Vannotti (63)); ferner findet man bei ihnen zyklusabhängige Schwankungen, Bauer-Sic et al (66), sowie typische Veränderungen in der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett, Haering (64).

Bei Applikation von NNR-Corticoiden, TSH, Endotoxin sowie bei verschiedenen internistischen Erkrankungen werden Veränderungen der ALP-Aktivität beschrieben (Merker (63), Waters (69), Lambers (60), Weissel (63), Wiltshaw (56, Valentine (55), u. A. m.).

Was ist die ALP?

Bei der ALP handelt es sich um eine Phosphomonoesterase mit Wirkungsoptimum bei pH über 9,0; sie kann Monoester der Phosphorsäure und nicht hochpolymerisierte Nucleinsäure hydrolysieren. Intrazellulär ist sie auch an De- und Transphosphorylisierungen beteiligt. Nach Rubini (63) soll sie eine inhibitorische Wirkung auf die DNS-Synthese haben. Chemisch findet man ein zinkhaltiges Polypeptid mit zwei Zn-Atomen pro Molekül (Schmidt (61)). Die Substratspezifität der ALP ist gering.

Wo findet man die ALP?

Die ALP ist mit cytochemischen Methoden in reifen neutrophilen Granulocyten (Stäbe und segmentkernige Granulocyten) nachzuweisen; nicht in Erythrocyten, Lymphocyten, Monocyten, Plasmazellen und Myeloblasten, Merker (68). Von Kaplow (69) wurde mit einer veränderten Methodik auch in einzelnen lymphoiden Zellen ALP-Aktivität nachgewiesen.

Elektronenoptisch fand Horn (64) den Enzymkomplex der ALP in den mittelgroßen Granula der neutrophilen Granulocyten lokalisiert. Diese weisen eine starke Elektronendichte auf. Sie entsprechen den spezifischen oder Sekundärgranula. Nach den Vorstellungen von Plenert (59) beginnt die Bildung des Enzymes auf der Stufe des Promyelozyten-Myelozyten. Die Enzymausstattung soll im Knochenmark abgeschlossen werden.

Wie wird die ALP reguliert?

Über die Beeinflussung der ALP durch Sexualhormone, NNR-Corticoide, TSH und einige organische und anorganische Faktoren berichten Merker (68), Plenert (59-68), Wiltshaw et al (56), Schäfer et al (68).

Problemstellung:

Die Aktivität einiger organspezifischer Phosphatasen, darunter auch die alkalische Leukocytenphosphatase, kann u. a. von Steroidhormonen beeinflusst werden. Die bisher mitgeteilten Untersuchungsergebnisse (Rosner et al (65), Bailer (70), Y Abul - Fadl (69), Schäfer + Fischer (68), Waters + Summers (69), Ebadi et al (66) sind z. T. widersprüchlich. Bei den mir bekannten Untersuchungen wurden die Testhormone intakten oder kastrierten Versuchspersonen bzw. -tieren verabreicht.

Auf die ALP-Aktivität haben neben den Sexualhormonen z. B. auch NNR-Corticoide, Stress, Schilddrüsenhormone, Umweltbedingungen u. a. m. ihren Einfluß. Deshalb sollte ein Versuchsmodell verwandt werden, bei dem die eigene Regulationsfähigkeit möglichst weitgehend ausgeschlossen ist. Die Versuchstiere - Ratten - wurden hypophysektomiert (hypex). Falls sich nach der Operation die Enzymaktivität stabil verhält, kann der Effekt einer Testsubstanz untersucht werden, ohne daß mit synergistischen bzw. antagonistischen Einflüssen von außen bzw. endogener Art gerechnet werden muß.

Da sich bei allen untersuchten Testsubstanzen ein Effekt auf die ALP-Aktivität beobachten ließ, sollte durch Verwendung des RNS-Synthese-Inhibitors Actinomycin D (Serva) geprüft werden, ob sich die Beeinflussung der ALP durch die Steroidhormone über einen Effekt auf die Transscription erklären läßt. Danach sollte es bei Stimulierung z.B. mit Östrogen nach Actinomycin D-Applikation nicht zum Ansteigen der Enzymaktivität kommen, da u. a. eine Bildung von m-RNS, die für die Synthese der ALP zuständig ist, durch Actinomycin D verhindert wird. Actinomycin D blockiert die Transscription der DNS.

Material und Methoden:

Versuchstiere:

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten verwandt. Ihr Gewicht betrug ca. 180 Gramm.

Die Tiere wurden in Gruppen zu 6 Tieren bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten und mit Leitungswasser und Trockenfutter ad lib. ernährt. In der ersten Woche nach der Hypophysektomie boten wir den Tieren zusätzlich 5 % Glukoselösung an. Die Hypophysektomie erfolgte in Äthernarkose durch Trepanation der Schädelbasis und Absaugen der Hypophyse. Der Operationserfolg wurde an der darauf eintretenden Hodenatrophie und durch Gewichtskontrolle geprüft. Kurz nach der Operation verloren die Tiere ca. 20 - 30 g Gewicht. Nach 6 - 10 Tagen wurde das Ausgangsgewicht ungefähr wieder erreicht und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu konstant.

Als Vergleichsgruppe standen 6 Ratten (Stamm sprague dawley) zur Verfügung; die Tiere waren ca. 3 Wochen vorher hypophysektomiert worden und hatten an keinem Versuch teilgenommen. Zur Bestimmung der ALP-Aktivität wurden Blutausstriche von der Schwanzspitze der Versuchstiere gewonnen. Dieses Verfahren hat sich als besonders schonend für die Tiere erwiesen.

Testsubstanzen und Applikationsart:

Alle Testsubstanzen wurden tief subkutan (sc) injiziert. Orgastiptin wurde auch intraperitoneal (ip) verabreicht. Bei den in öligen Medien gelösten Testsubstanzen wurde bei der subkutanen Injektion keine Granulombildung oder Nekrose beobachtet.

Im Einzelnen wurde injiziert:

17- β -Östradiol (Progynon, Boleosum) Fa. Schering

- Progesteron (Proluton) "
- Testosteron (Testoviron)
- ein Östrogenhemisuccinat (Orgastiptin)
- physiologische Kochsalzlösung
- öliges Lösungsmittel Fa. Schering
- Actinomycin D Fa. Serva

Cytochemischer Nachweis der ALP:

Zum cytochemischen Nachweis der ALP wurde das Verfahren von Merker und Heilmeyer (60) benutzt. Es handelt sich dabei um eine sog. Azokupplungsreaktion. Das Verfahren arbeitet als Simultanmethode mit einem unphysiologischen Substrat - Na-a-Naphthylphosphat - und Variaminblausalz B als Farbentwickler. Die hydrolytische Abspaltung von Phosphorsäure durch die ALP und die Bildung des unlöslichen Azofarbstoffes erfolgen unmittelbar nebeneinander. Der sichtbare Farbniederschlag findet sich also am Ort der Enzymwirkung und dient als direkter Nachweis. (Abb.1)

Die aus Rattenblut hergestellten Blutausstriche wurden luftgetrocknet und 12 - 14 Stunden nach Abnahme 30 Sekunden lang in einer Methanol/Formalinlösung (Verhältnis 1:10) bei ca. 4 ° C fixiert. Danach Lufttrocknung und kräftige Spülung mit Leitungswasser. Anschließend wurden die Präparate für 20 Minuten bei ca. 4 ° C in einer Na- Naphthylphosphat-Variaminblausalzlösung inkubiert. Nach kräftigem Spülen in Leitungswasser werden die Ausstriche 15 Minuten in Meyers Hämalaun gefärbt. Nach erneutem Spülen bleiben die Präparate 15 Minuten in Leitungswasser stehen (sog. Bläuen). Zum Schluß werden die Präparate in einem wässrigen Medium (z.B. Gelatinol) eingedeckt.

Die Inkubationslösung wird wie folgt hergestellt:

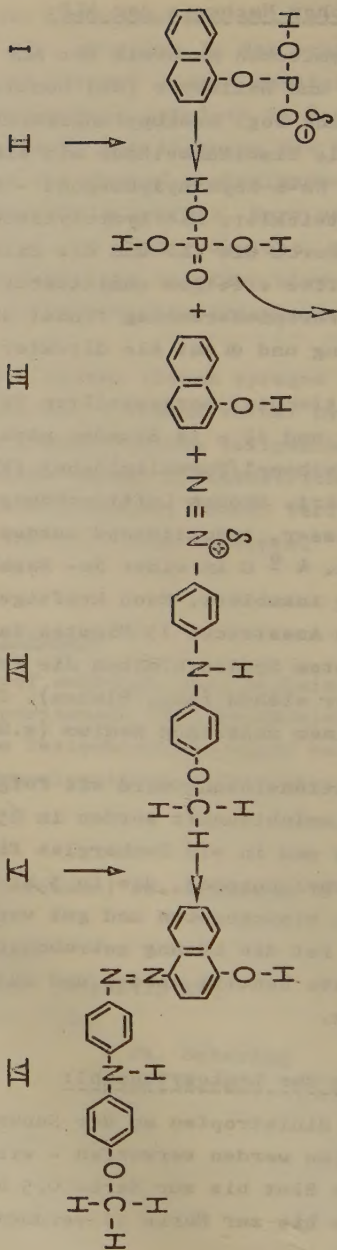
34 mg Variaminblausalz werden in 25 ml 2 % Na-Veronalpuffer gut gelöst und in ein Becherglas filtriert. Dazu werden 16 mg Na-a-Naphthylphosphat, die in 5 ml 2 % Na-Veronalpuffer gelöst sind, hinzugegeben und gut vermischt. Nach Abkühlung auf 4 ° C ist die Lösung gebrauchsfertig; sie soll nur für einen Ansatz benutzt werden und muß jeweils frisch zubereitet werden.

Bestimmung der Leukocytenzahl:

Aus einem Blutstropfen an der Schwanzspitze - die ersten zwei Tropfen werden verworfen - wird mit einer Leukopipette kapilläres Blut bis zur Marke 0,5 aufgezogen und mit 4 % Essigsäure bis zur Marke 11 verdünnt. Das Gemisch wird ca.

Cytochemischer Nachweis d. ALP

- 6 -



- I Na- α -Naphthylphosphat
- II Alk.-Leukozyten-Phosphatase
- III Zwischenprodukt, chromogene Vorstufe
- IV Variaminblausalz B als Farbentwickler
- V Azokupplungsreaktion
- VI entstandener Azofarbstoff

4 Minuten geschüttelt und in eine Neugebauer-Zählkammer eingebracht. Die Leukocytenzahl wurde bei üblicher Zählweise als Mittelwert aus drei Zählungen bestimmt.

Ermittlung der Enzymaktivität:

Zur Ermittlung der Enzymaktivität wird die Menge des bei der Azokupplung entstandenen Niederschlages im Cytoplasma der neutrophilen Granulocyten gemessen. Es wird ein Aktivitätsindex ermittelt (Kaplow (69), Brodell a. Swisher (54)). Dazu werden pro Ausstrich 100 neutrophile Granulocyten je einer Reaktionsklasse zugeordnet. Reaktionsklasse 0 bis Reaktionsklasse 4. (0 = fehlende Aktivität, 4 = das gesamte Cytoplasma ist mit Niederschlag ausgefüllt). (Abb. 2)

Die Zahl der den einzelnen Reaktionsklassen zugeordneten Zellen wird mit dem entsprechenden Klassenfaktor (0 - 4) multipliziert und die Produkte addiert. Die erhaltene Summe wird Aktivitätsindex genannt und erlaubt Rückschlüsse auf die Enzymaktivität (Merker u. Heilmeyer (60). (Abb. 3)

Bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse muß erwähnt werden, daß die ermittelten Resultate nur semiquantitativ Aussagen gestatten. Über die tatsächliche Enzymaktivität (bzw. den Substratumsatz) kann keine genaue Angabe gemacht werden; bei der Bearbeitung der Blutausstriche geht Enzymaktivität verloren, die Zuordnung der Zellen zu den Reaktionsklassen wird von subjektiven Gesichtspunkten des Auszählenden beeinflusst.

Für eine Verlaufskontrolle der Enzymaktivität ist das Verfahren jedoch gut geeignet, da die Aktivitätsschwankungen mit ausreichender Genauigkeit erfasst werden, und die o.g. Störfaktoren konstant bleiben. Auch zeigen vergleichende Untersuchungen zwischen cytochemischer und chemisch analytischer Aktivitätsbestimmung an isolierten Zellen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse (Brodell a. Swisher (54), Ebadi et al (66), Valentine et al (52).

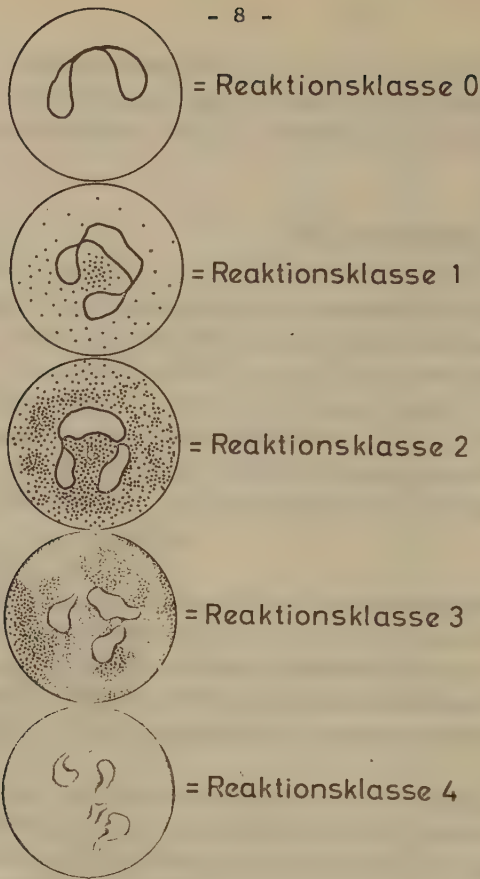


Abb.2 : Aktivitätsstufen der alkalischen Neutrophilenphosphatase

Reaktionsklassen	Anzahl der Zellen	Klassenfaktoren	Produkte
0	8	0	0
1	27	1	27
2	40	2	80
3	24	3	72
4	1	4	4
100		Aktivitätszahl - 183 des Ausstriches	

Abb.3 : Beispiel zur Ermittlung einer Aktivitätszahl

Versuchsablauf:

Die Untersuchungen wurden zwischen Herbst 70 und Frühjahr 71 durchgeführt. Da in der Literatur für Ratten keine Normalwerte der ALP-Aktivität beschrieben waren, wurde in Vorversuchen die Methode von Merker und Heilmeyer (60) so modifiziert, daß die Aktivitätsindizes bei diesem Versuchsmodell in einem mittleren Bereich lagen und Schwankungen der Indizes bei gesteigerter oder verminderter Enzymaktivität erfasst werden konnten.

Nach Ermittlung von Normalwerten wurden die Versuchstiere hypophysektomiert und das Verhalten der ALP verfolgt. In den ersten postoperativen Tagen wurde die Enzymaktivität 2 mal pro Tag, dann täglich und zum Schluß alle 2 Tage bestimmt. Nachdem sich ein neuer, stabiler Ausgangswert eingependelt hatte, wurde mit der Injektion der verschiedenen Testsubstanzen begonnen. Nach Applikation einer Testsubstanz wurde die ALP solange bestimmt, bis der Ausgangswert wieder erreicht war. Vor jeder neuen Hormongabe wurde eine versuchsfreie Woche eingeschoben, in der die Enzymaktivität mehrmals kontrolliert wurde.

Als Kontrolle wurden 2 Tiergruppen mit den beiden in den Versuchen verwandten Lösungsmitteln - physiologische NaCl und öliges Lösungsmittel - behandelt. Um eine durch die Injektionsweise bedingte Aktivitätsänderung ausschließen, wurde eine Versuchsgruppe mit einer Hormonart einmal ip und einmal sc gespritzt.

Statistik:

In der vorliegenden Versuchsanordnung bestimmen drei Faktoren die Meßergebnisse:

1. die Tiere
2. die Hormonart
3. die Zeit der Hormongabe

Ein Einfluß der Injektionsart z. B. subcutan, intramuskulär bzw. intraperitoneal kann ausgeschlossen werden (mündliche Mitteilung der Forschungs-Abteilung der Fa. Schering).

Nach Ansicht verschiedener Autoren besteht für die Stimulierung der ALP-Aktivität durch Steroidhormone keine Dosis-Index-Beziehung (Bailer (71) et al).

Zur statistischen Beurteilung des zeitlichen Verlaufes nach Hormongabe eignet sich das Modell der doppelten Varianzanalyse. Dabei werden die Schwankungen der einzelnen Versuchstiere untereinander bei der Beurteilung der zeitlichen Änderung eliminiert. Die Varianzanalyse beruht auf einer rein arithmetischen Zerlegung der Quadratsumme (=Summe der Quadrate der Abweichungen der Stichproben vom Mittelwert). Man zerlegt in eine Summe von Bestandteilen, deren jede einer Variationsursache entspricht.

Zur Prüfung der Frage, ob sich zwei Aktivitätsverläufe parallel verhielten, wurde das partiell hierarchische Modell der Varianzanalyse herangezogen.

Abb. 4

Endergebnis einer doppelten Varianzanalyse,
z. B. nach Injektion von Progynon B oesum:

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw. Gr.	1346.3116	6	502.6900	12.23
in. Gr.	59499.0649	21	2833.2888	68.98
Rest	5175.1169	126	41.0723	
Summe	66020.4935	153		

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

MAQ = Mittleres Abweichungsquadrat

f = Freiheitsgrad

zw.Gr. = Abweichung zwischen den Tieren

in.Gr. = Änderung der Werte über die Zeit

In den Tabellen sind jeweils 6 Werte aufgeführt. Der 1. entspricht der Summe der Quadrate der Einzelwerte zu einem Zeitpunkt, der 2. der Summe der Einzelwerte zu einem Zeitpunkt, der 3. der Anzahl der Einzelwerte, der 4. dem Mittelwert, der 5. der Standartabweichung, der 6. der korrigierten Standartabweichung.

Ergebnisse:

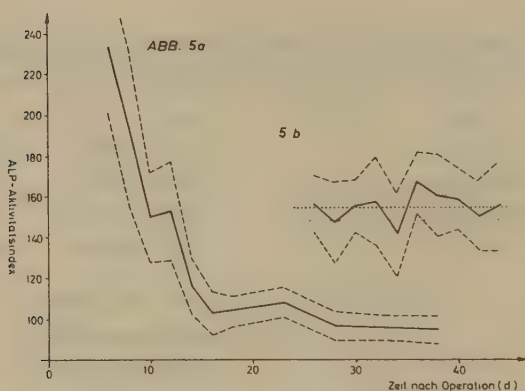
Vorversuche:

Mit der eingangs beschriebenen Methode bestimmt man an Rattenblutausstrichen Aktivitätsindizes, die zwischen ca. 300 und 400 schwanken.

Orientierende Untersuchungen mit veränderten Reaktionsbedingungen - Temperatur, Konzentration der Inkubationslösung, Inkubationszeit - ergaben, daß die Ergebnisse unter den in 3 c beschriebenen Bedingungen am Besten auszuwerten waren. Dabei lagen die Indizes im Mittel bei 154. Bei diesem Ausgangswert können Aktivitätsschwankungen in beiden Richtungen beobachtet werden.

An einer Versuchsgruppe von 5 männlichen Bastard-Ratten wurde zur Kontrolle über 10 Tage die ALP-Aktivität täglich bestimmt. Dabei lagen die Mittelwerte zwischen 141 und 167.

(Abb. 5a Tab. 1)



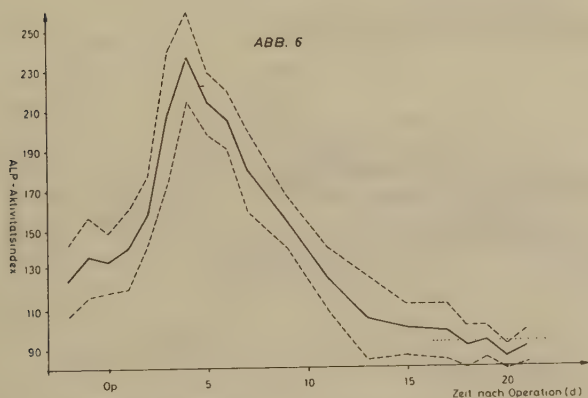
8 männliche Bastard-Ratten wurden in einem weiteren Vorversuch hypophysektomiert und die ALP-Aktivität vom 6. postoperativen Tag (pod.) an bestimmt. Hierbei lagen die präoperativen (präop.) ALP-Indizes im Mittel zwischen 154 und 160. Am 6. pod. konnte ein Index von 133 ermittelt werden. Bis zum 16. pod. fiel die Aktivität steil ab und erreichte nach ca. 25 bis 30 Tagen unter leichten Schwankungen einen neuen "Normalwert" (Index um 95). (Abb. 5b)

An 10 Ratten (Stamm sprague dawley), die Tiere waren seit ca. 6 Wochen hypophysektomiert, konnte zum Vergleich eine Bestimmung der ALP vorgenommen werden, Hier lag das Mittel bei 89.

Verhalten der ALP nach Hypophysektomie:

An einem Kollektiv von 16 Ratten wurde die ALP über einen Zeitraum von 3 Wochen beobachtet. Präop. wurden ALP-Indizes zwischen 120 und 133 bestimmt. Zwischen der 24. und der 48. Stunde (pod.) steigt die Enzymaktivität deutlich an und erreicht nach weiterem steilen Anstieg am 4. postoperativen Tag ein Maximum (Index 237). In den folgenden Tagen fällt die Aktivität ab, erreicht ca. am 9. pod. Tag den präop. Ausgangswert und pendelt sich bis zum 20. Tag nach der Operation auf eine neue stabile Ausgangslage ein. Mittelwerte zwischen 85 und 93. Es sollte erwähnt werden, daß die Streuung der ALP-Aktivität vor der Hypophysektomie größer ist als nach Erreichen des neuen Normalwertes.

Abb. 6 Tab. 2



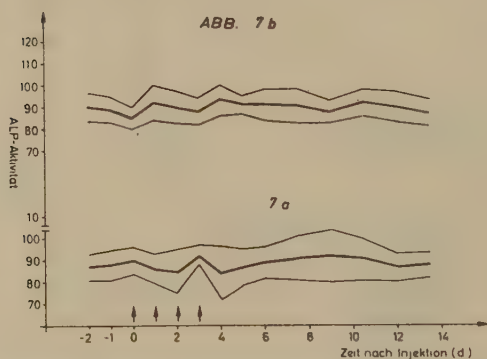
Kontrollgruppen:

Zur Kontrolle wurden die beiden Lösungsmittel der in den Versuchen verwandten Hormonarten herangezogen. Orgastiptin und Actinomycin D waren in aqua dest, die übrigen Testsubstanzen in einem öligen Medium gelöst.

Es wurden zwei Versuchsgruppen mit je 6 Tieren gebildet. Die Gruppe A bekam in 24-stündlichem Abstand 4 x 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert. Die Kontrollgruppe B wurde in gleicher Weise mit dem öligen Lösungsmittel behandelt. Bei beiden Versuchsgruppen konnte bei einer 14-tägigen Beobachtungsdauer keine signifikante Abweichung vom Normalwert festgestellt werden. Auch unterscheiden sich die beiden Aktivitätsverläufe nicht voneinander. Die Aktivitätsindizes lagen zwischen ca. 83 und 94; die Standartabweichung überschritt mit maximal ca. 14 nicht die in Ruhe.

Abb. 7a und 7b

Tab. 3 A und 3 B



Auf eine Berechnung der Signifikanz einer Abweichung der Aktivität über die Zeit wurde bei Gruppe B verzichtet; die ALP verhält sich im gleichen Sinne, die Standartabweichung ist sogar noch geringer.

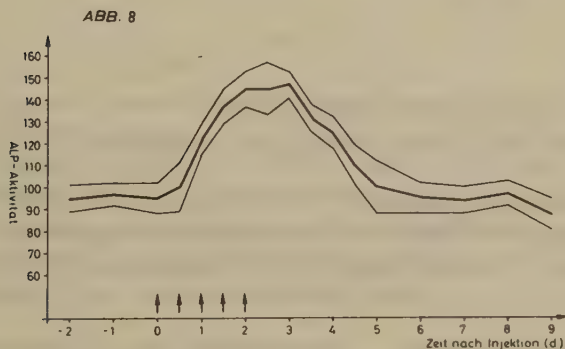
Applikation von Orgastiptin:

Orgastiptin ist ein wasserlösliches Östrogenhemisuccinat. Es soll keine östrogenspezifische Wirkung - im Sinne der sexagenen Wirkung - haben und wird in der Klinik als Hämostiptikum angewandt.

Diese Versuchsreihe sollte prüfen, ob trotzdem eine Beeinflussung der ALP festzustellen ist. Weiter sollte durch unterschiedliche Applikationsweise untersucht werden, ob die Injektionsart einen Einfluß auf die Enzymaktivität nimmt.

Im ersten Versuch wurde 8 Tieren 5 x in 12-stündlichem Abstand 0,5 mg Orgastiptin tief sc. injiziert. Nach ca. 24 h war ein erster Anstieg der ALP-Aktivität zu messen. Zwischen dem 2. und 4. Tag nach Injektion wurden Aktivitätsmaxima zwischen 145 und 150 erreicht. Danach fiel die Indizes nahezu spiegelbildlich ab und hatten am 5. bis 7. Tag die Ausgangslage wieder erreicht.

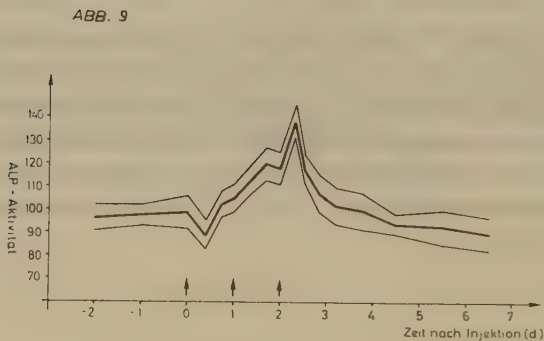
Abb. 8 Tab. 4



Eine weitere Versuchsgruppe (n=8) bekam in 24-stündlichem Abstand 3 x 0,5 mg intraperitoneal gespritzt. Bei dieser Applikationsweise wird die Testsubstanz geringfügig schneller resorbiert. Bis auf einen kurzfristigen Aktivitätsabfall um die achte Stunde herum, verhält sich die ALP ähnlich wie bei subcutaner Injektion.

Abb. 9

Tab. 5



Die Parallelität der beiden Kurvenverläufe wurde mit dem partiell hierarchischen Modell der Varianzanalyse geprüft.

Auch das Östrogenhemisuccinat ist also in der Lage, die ALP zu aktivieren. Es kann kein wesentlicher Unterschied der Stimulation - bedingt durch die Injektionsweise - beobachtet werden.

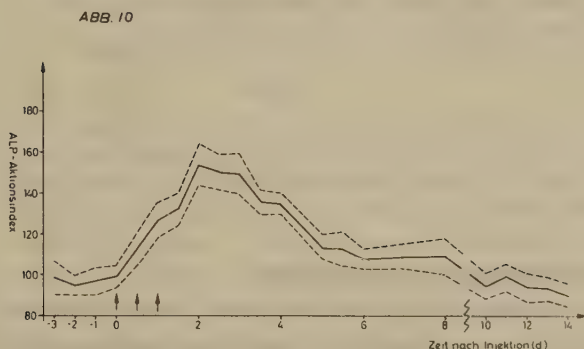
Applikation von Östrogen:

Als Testsubstanz wurde in dieser Versuchsanordnung Progynon B oleosum - ein 17- β -Östradiol - verwandt. Den Tieren wurde in 12stündlichem Abstand 3 x 0,5 mg des Hormones verabreicht. Da das Mittel in öligem Medium gelöst ist und tief s.c. gespritzt wird, muß mit einer langsameren Resorption gerechnet werden. Es wird über längere Zeit ein gleichmäßiger Serumspiegel aufrechterhalten.

Nach ca. 12 h kommt es zu einem ersten Ansteigen der Enzymaktivität. Bis zum 2. Tag steigt die Aktivität weiter an und erreicht Maxima bis 154. Nach einem kurzen Plateau sinkt der Index stufenweise ab und pendelt sich bis zum 8. - 10. Tag auf den Normalwert ein.

Abb. 10

Tab. 6



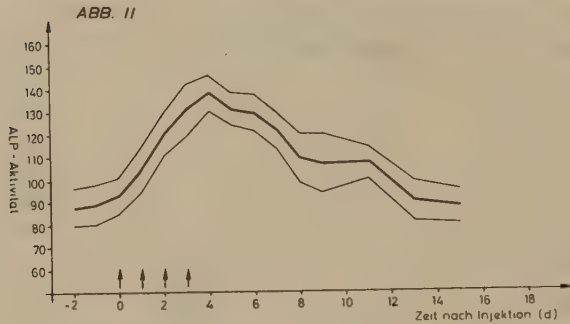
Progynon B oleosum bewirkt einen raschen und deutlichen Anstieg der ALP-Aktivität. Im Vergleich zu Abbildung 9 ist der Kurvenverlauf deutlicher und ausgeglichener. Dies wird auf den gleichmäßigeren Serumspiegel des Hormones zurückgeführt.

Applikation von Progesteron:

Einem Kollektiv von 12 hypophysektomierten Ratten wurde in 24-stündlichem Abstand 4 x 0,25 mg Progesteron tief s.c. injiziert. Der Aktivitätsverlauf ähnelt dem nach Östrogen. Nach geringerem Ansteigen der Indizes innerhalb der ersten 24 h wird am 4. Tag ein Maximalwert gemessen - Index 139 - . Der Abfall der Enzymaktivi-

tät erfolgt kontinuierlich mit einer Schulter zwischen dem 9. bis 12. Tag. Nach 13 bis 15 Tagen ist der Ausgangsindex wieder erreicht.

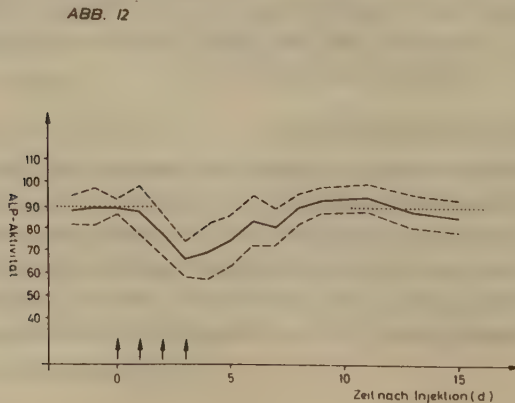
Abb. 11 Tab. 7



Applikation von Testosteron:

Eine Versuchsgruppe von 6 Ratten wurde nach Gabe von 4 x 0,25 mg Testosteron (Injektionsabstand 24 Stunden) über 14 Tage beobachtet. Nach ca. 24 Stunden fällt die ALP-Aktivität zunächst langsam und dann schneller bis zum 3. Tag nach der ersten Injektion ab. Zwischen dem 4. und 8. Tag steigt die Enzymaktivität wieder an und erreicht den Ausgangswert. Als Minimalwert wird nach 72 Stunden ein Index von 66 ermittelt.

Abb. 12 Tab. 8



Applikation von Östrogen und Actinomycin D:

Als Abschluß der Untersuchungen wurden zwei Gruppen zu 6 und 8 Tieren gebildet. Die Gruppe mit 6 Tieren (V 1) wurde zunächst mit 1 x 50 mg/150 g K6 Actinomycin D und nach 6 bzw. 24 Stunden mit je 0,5 mg 17- β -Östradiol behandelt. Der Gruppe aus 8 Tieren (V 2) wurde 1 x 0,5 mg 17- β -Östradiol und nach 6 Stunden 1 x 50 mg/ 150 g Kg Actinomycin D verabreicht.

Der Injektionsabstand von 6 Stunden wurde in Anlehnung an die Arbeit von Tompkins () gewählt. In dieser Zeit sollte die Induzierung der ALP durch das Hormon erfolgt sein.

Die Resultate der Gruppe V 1 zeigt die

Abb. 13a

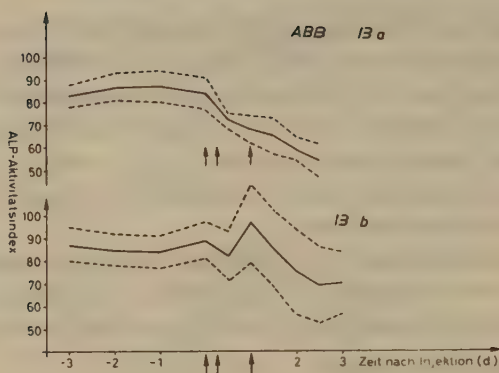
Tab. 9

Nach Gabe der Testsubstanzen sinkt die Aktivität kontinuierlich ab. Als Minimalwert wird ein Index von ca. 54 nach 36 Stunden gemessen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren noch alle Tiere am Leben. Im Verlaufe der nächsten 48 - 72 Stunden verstarben alle Tiere. Es wurden präterminale und terminale Indizes zwischen 45 und 16 ermittelt. Diese Ergebnisse wurden bei der Beurteilung des Aktivitätsverlaufes nicht berücksichtigt, da bei Tieren, die im Versuch oder auch ohne Behandlung vorzeitig verstarben, ähnliche Aktivitätsindizes ermittelt werden konnten.

Bei der Gruppe V 2 wird 24 Stunden nach Hormongabe ein Maximum von ca. 96 erreicht. Danach fällt die Aktivität bis zum 3. Tag ab (Minimalindex 69). Zwischen dem 3. und 5. Tag sterben auch in diesem Versuch die Tiere. Die noch ermittelten Indizes verhalten sich ähnlich wie in V 1 und werden aus o. g. Gründen ebenfalls nicht berücksichtigt. Im Diagramm fällt bei V 2 nach der Injektion der stark verbreiterte Streubereich der Indizes auf.

Abb. 13b

Tab. 10



Bei beiden Versuchsanordnungen ist die Änderung gegenüber dem Ausgangswert signifikant. Die Aktivitätsverläufe der beiden Versuche sind nicht parallel. s. Ergebnis PHMdVA.

Verhalten der Leukocytenzahl während der Gabe von Steroidhormonen:

Bei allen oben beschriebenen Versuchen wurde die Zahl der Leukocyten bestimmt. In der Regel konnten Werte zwischen 15000 und 25000 ermittelt werden. Da sich während der einzelnen Untersuchungen keine signifikanten Abweichungen von den Normalwerten nachweisen ließen, wird auf eine Darstellung verzichtet. Über das Verhalten der Gesamtleukocyten nach der Hypophysektomie kann keine Aussage gemacht werden. Im terminalen Stadium konnte eine ausgeprägte Leukocytose mit Zellen der Reaktionsklasse 0 beobachtet werden.

Diskussion:

An unbehandelten männlichen Ratten konnte ein Aktivitätsindex der alkalischen Leukocytenphosphatase (ALP) von ca. 155 ermittelt werden, wobei über längere Zeit keine signifikanten Schwankungen auftraten. Nach der Hypophysektomie kam es in 4 Tagen zu einem steilen Anstieg der Enzymaktivität (Maxima bei ca. 240). Danach fiel die Enzymaktivität wieder ab, erreichte am neunten po. Tag den Ausgangswert und pendelte sich in der dritten P.O.-Woche auf einen neuen, signifikant niedrigeren Wert ein (Index im Mittel 93). Die für die endokrine Regulation sehr einschneidende Hypophysektomie führt also zunächst zu einer starken Aktivierung der ALP, um dann nach einer Zeit der Anpassung ein wesentlich tieferes Aktivitätsniveau zu erreichen.

Die Aktivitätssteigerung wird als Resultate der Entgleisung der Regulationssysteme der Nebennierenrinde, Sexual- und Schilddrüsenhormone verstanden. Es ist allerdings unklar, ob noch andere Faktoren an diesem Geschehen beteiligt sind. Nach ca. 14 Tagen scheinen sich die Regelgrößen, die die ALP beeinflussen können, stabilisiert zu haben. Obwohl Testosteron sicher nur noch in Minimalkonzentration anfällt und man bei Berücksichtigung der Ergebnisse alleiniger Testosterongabe eher einen Anstieg der ALP-Aktivität erwarten dürfte, ist die Aktivität jetzt deutlich geringer. Dies Ergebnis kann sicher nur durch die bei der Hypophysektomie neu entstandenen Verhältnisse erklärt werden - Abfall der Aktivität durch Verminderung der stimulierenden Hormone.

Die weiteren Untersuchungen zeigen, daß alle drei untersuchten Steroidhormone - Östrogen, Progesteron und Testosteron - einen Einfluß auf die Aktivität der ALP haben.

Nach Gabe von Orgastiptin (ein Östrogenhemisuccinat) wurde nach 24 h ein erster Anstieg der Aktivität und zwischen dem 2. - 4. Tag Indizes bis 150 beobachtet.

Um den 8. Tag nach Injektion wird der Ausgangswert wieder erreicht.

Die Injektion von Östrogen (17- β -Östradiol) bewirkte nach 12 - 14 Stunden zunächst einen leichten Anstieg; nach ca. 48 Stunden wurde ein Maximum von 154 erreicht. Nach 8 - 10 Tagen konnte keine Beeinflussung der ALP-Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Ähnlich verhielt sich die ALP auch nach Progesteron. Der Anstieg begann ebenfalls nach ca. 24 h, am 4. Tag nach Applikation wurde das Maximum der Enzymaktivität bestimmt (Index 139). Zwischen dem 9. - 12. Tag wurde die Ausgangslage wieder erreicht.

Nach Testosteron kam es nach 24 Stunden zu einem Absinken des Aktivitätsindex; am 3. Tag wurde das Minimum erreicht (Index 66). Bis zum 8. Tag nach Hormongabe stieg die Aktivität wieder auf Normalwerte an.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren kann festgestellt werden, daß nach Gabe von Steroid-Hormonen eine erste Reaktion nach ca. 24 Stunden erkennbar wird. Die Reaktionsdauer wird je nach Injektionsdauer, Applikationsweise und Resorptionsverhältnissen unterschiedlich sein; bei den mir bekannten Untersuchungen wird aber der Normalwert im allgemeinen 7 - 9 Tage nach der letzten Injektion wieder erreicht.

Zur Frage der Beeinflussung der ALP durch verschiedene Substanzen unter Berücksichtigung der Leukocytenkinetik läßt sich Folgendes feststellen. Die Überlebenszeit reifer Granulozyten wird von Alker et. al. (61) mit 2-4 Tagen angegeben. Die Ausreifung von Myelozyten zu segmentkernigen Granulozyten beträgt nach Boll (66) ca. 4 Tage. Bis zum Myelozytenstadium sollte die Proteinsynthese-Enzymsynthese fast vollständig abgeschlossen sein (Thorell (47)). Andererseits wird von Spicer und Hardin (69)

angegeben, daß die ALP- enthaltenden spezifischen Granula zuerst in den Promyelozyten auftreten und bis zur Ausreifung der segmentkernigen Granulozyten eine Zunahme dieser Granula zu beobachten ist. Damit übereinstimmend fanden auch Trubowitz (59) und Lambers (60) im Knochenmark niedrigere Aktivitäten als im peripheren Blut. Weber (70) fand nach Gabe von Actinomycin und Puromycin vom 4. Tag nach Injektion eine Abnahme der ALP-Aktivität bei gleichzeitiger Zunahme der Zellen der Reaktionsklasse 0, was sich bei Berücksichtigung der Ergebnisse obengenannter Autoren mit einer Enzymsynthesehemmung in den Vorstufen erklären läßt (Boll, Alker, Thorell). Außer der Steuerung der ALP über die primäre Enzymsynthese im Knochenmark bis zum Myelozytenstadium muß eine Beeinflussung auch im peripheren Blut in den reifen neutrophilen Granulozyten bzw. in den sich noch im Knochenmark befindlichen heranreifenden Zellen möglich sein. Merker (61), Bailer (70) und eigene Untersuchungen zeigten nach unterschiedlichen Reizen bzw. nach Hormongaben einen Anstieg der ALP-Aktivität schon nach 4 - 24 Stunden bei statistisch nicht signifikanten Schwankungen der Leukocyten bzw. der ALP-positiven neutrophilen Granulozyten. Dabei ist noch ungeklärt, ob die Steigung der ALP-Aktivität über eine zusätzliche Enzymsynthese de novo oder über eine Stimulation der vorhandenen Enzymmenge erfolgt.

Die Ergebnisse nach Östrogen-Gabe stimmen mit anderen Untersuchern - Schäfer et. al (68), Botte et. al. (54), Ebadi (66), Bailer (70), Rosner (65) Y Abul Fadl (69) u. A. m. - überein.

Dabei scheint die sexagene Wirkung des Östrogenmoleküls nicht mit der Beeinflussung der ALP gekoppelt zu sein. Orgastiptin soll keine sexagene Wirkung haben, beeinflusst aber die ALP in gleicher Weise wie die in der Gynäkologie verwandten Östrogene.

Bailer (70) beobachtete nach Gabe von Progesteron keinen stimulierenden Effekt auf die ALP. Bei kombinierter Applikationsweise mit Östrogen wurde von einer verminderten Stimulation im Vergleich zur reinen Östrogengabe berichtet. Die Ergebnisse unseres Versuchsmodells stehen dazu im Widerspruch und bestätigen die Arbeiten Y Abul Fadl (69), Ebadi (66). Auf einen Antiöstrogeneffekt des Progesterons - Emmens (64), Rosner et. al. (65) - kann in diesem Zusammenhang nicht geschlossen werden.

Rosner et. al. (65) und Lee (65) berichteten von einer inhibitorischen Wirkung androgener Substanzen auf die ALP. Eine solche Wirkung konnten wir bei unseren Untersuchungen ebenfalls feststellen.

Blum (62), Wend und Budde (61) und Merker (60) diskutieren als Ursache des Anstiegs der ALP nach Reizstoffen eine Steigerung der Leukozytenzahl. Andere Untersuchungen von Merker und die Resultate von Bailer (70) können diese Hypothese nicht unterstützen. In unseren Untersuchungen - bei allen Versuchen fanden sich nur unbedeutende Schwankungen der Leukozytenzahl - ergab sich auch kein Hinweis für diese Annahme. Eine Aktivitätssteigerung allein im Zusammenhang mit einer erhöhten Leukocytenzahl ist auch deshalb wenig wahrscheinlich, weil bei Ausschwemmung unreifer Formen eher erniedrigte Aktivitätsindizes zu erwarten wären.

Weber (70) fand nach Actinomycin und Puromycin eine Abnahme der ALP-Aktivität. Botte und Koide (54) fanden nach Östrogen- und Actinomycin-Gabe nur eine unbedeutende Steigerung der Alkalischen Phosphatase des Uterus. Nach Actinomycin- und Östrogen-Gabe konnten wir eine Abnahme der ALP-Aktivität feststellen. Der von Tompkins et. al (67) beschriebene paradoxe Effekt nach Östrogenstimulierung und nachfolgender Actinomycingabe konnte nicht nachvollzogen werden. Der paradoxe Effekt beruht darauf, daß die ALP zunächst durch Östrogen stimuliert wird. Ein sechsständiger Zwischenraum bis zur Actinomycingabe reicht zur Bil-

derung der für die ALP-Produktion verantwortlichen m-RNS aus (Tompkins (67), Garren et. al. (64)). Eine Gegenregulation gegen die m-RNS ist dann nicht mehr möglich, da alle weiteren m-RNS-Bildungen durch Actinomycin verhindert werden; Actinomycin hemmt die RNS-Synthese selektiv durch Blockierung der RNS-Polymerase. Es müßte also ein höherer Anstieg der ALP als nach alleiniger Östrogengaben erfolgen.

Die Beobachtungsdauer der beiden zuletzt besprochenen Versuche betrug hier nur 3 Tage; danach starben die Tiere. Die Aussagekraft dieser Versuche ist deshalb sehr schwach. Unklar ist, warum Actinomycin hier so toxisch wirkte. Die Dosierung liegt noch unter der von Botte und Koide (54) und Goodman (67) angegebenen Dosis. Goodman verwandte ebenfalls hypophysektomierte Ratten.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit berichtet über die Beeinflussung der ALP durch Steroidhormone. Um eine Fremdregulation möglichst weitgehend auszuschließen, wurden die Versuchstiere hypophysektomiert. Zur Ermittlung der Enzymaktivität wird der Enzymnachweis von Merker und Heilmeyer (60) modifiziert und die Aktivitätszahl bzw. Index nach Brodell und Swisher (54) bestimmt.

Als Testsubstanzen werden ein 17- β -Östrogen, ein wasserlösliches Östrogenhemisuccinat, Progesteron, Testosteron und Actinomycin D injiziert.

An intakten Versuchstieren werden als Normalwerte im Mittel Aktivitätsindizes von 155 ermittelt. Nach der Hypophysektomie steigt die Aktivität steil an und erreicht unter stufenweisem Abfall nach ca. 3 Wochen einen neuen, im Vergleich zu nichtoperierten Tieren, niedrigeren Ausgangswert. Nach Gabe von Östrogen, Östrogenhemisuccinat und Progesteron kann ein Anstieg der Aktivität gemessen werden. Ein Antiöstrogeneffekt des Progesterons kann nicht nachgewiesen werden. Testosterongabe bewirkt eine Erniedrigung des Aktivitätsindex. Die erste Reaktion auf eine Hormongabe wird im allgemeinen nach ca. 24 Stunden ermittelt. Die Leukocytenzahl verhält sich in unseren Versuchsergebnissen konstant.

Blockiert man die Enzymsynthese durch Actinomycin D, so kommt es nach Östrogenstimulation nicht zu einem Anstieg der Aktivität; nach der Stimulierung des Enzyms durch Östrogen mit nachfolgender Blockierung der RNS-Polymerase durch Actinomycin D kann die erwartete erhöhte Aktivitätssteigerung nicht beobachtet werden.

Die Aktivitätssteigerung nach unterschiedlichen Reizen kann nicht allein über eine gesteigerte Enzymsynthese im Knochenmark bis zum Myelozytenstadium erklärt werden. Auch im peripheren Blut und den im Knochenmark weiter heranreifenden Zellen muß eine Stimulierung möglich sein. Ungeklärt bleibt, ob die Aktivitätssteigerung über eine zusätzliche Enzymsynthese de novo oder über eine Stimulierung vorhandener Enzymmengen erfolgen kann.

Ergebnis der VA entspr. Abb. 7 Tab-3a + b

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	253.8076	5	50.7615	.60
in.Gr.	525.5384	12	43.7948	.52
Rest	5051.6923	60	84.1948	
Summe	5831.0384	77		

Legende:

Ergebnis der DVA nach 4 x 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung subcutan im Abstand von 24 h, n = 6, Beobachtungsdauer p.i. = 14 d. Im zeitlichen Verlauf der ALP-Aktivität ist keine signifikante Abweichung vom Normalwert zu beobachten.

Ergebnis der VA entspr. Abb. 8 Tab. 4

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	1190.5220	7	170.0745	2.96
in.Gr.	54549.4412	16	3409.3400	59.53
Rest	6413.8529	112	57.2665	
Summe	62153.8162	135		

Legende:

Ergebnis der DVA nach 5 x 0,5 mg Orgastiptin subcutan in 12 h Abstand, n = 8, Beobachtungszeitraum p.i. = 9 d. Die Änderung der ALP-Aktivität im zeitlichen Verlauf ist signifikant.

Ergebnis der Va entspr. Abb. 9 Tab. 5

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	2622.0000	7	374.5714	15.85-
in.Gr.	20341.1176	16	1271.3198	57.20
Rest	2488.9999	112	22.2232	
Summe	25452.1176	135		

Legende:

Ergebnis der DVA nach 3 x 0,5 mg Orgasiptin ip. im Abstand von 24 h, n = 8, Beobachtungsdauer p.i. = 7 d. Die Änderung der ALP-Aktivität im zeitlichen Verlauf ist signifikant.

Ergebnis der VA entspr. Abb. 10 Tab. 6

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	1346.3116	6	502.6900	12.23
in.Gr.	59499.0649	21	2833.2888	68.98
Rest	5175.1169	126	41.0723	
Summe	66020.4935	153		

Legende:

Ergebnis der DVA nach 3 x 0,5 mg 17- β -Östradiol sc., Injektionsabstand = 12 h, n = 7, Beobachtungszeitraum p.i. = 14 d. Im zeitlichen Verlauf der ALP-Aktivität ist eine signifikante Änderung des Index zu beobachten.

Ergebnis der VA entspr. Abb. 11 Tab. 7

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	839.3333	11	76.3030	.84
in.Gr.	53235.3667	14	3802.5261	42.13
Rest	13898.5000	154	90.2500	
Summe	67973.2001	179		

Legende:

Ergebnis der DVA nach 4 x 0,25 mg Progesteron subcutan, n = 12, Injektionsabstand = 24 h, Beobachtungsdauer p.i. = 15 d. Nach der Applikation von Proluton ist im zeitlichen Verlauf der ALP-Aktivität eine signifikante Änderung des Aktivitätsindex zu ermitteln.

Ergebnis der VA entspr. Abb. 12 Tab. 8

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	108.2666	5	21.6533	.29
in.Gr.	5794.6000	14	413.9000	5.71
Rest	5070.7333	70	72.4390	
Summe	10973.6000	89		

Legende:

Ergebnis der DVA nach 4 x 0,5 mg Testosteron subcutan, n = 6, Injektionsabstand = 24 h, Beobachtungsdauer p.i. = 15 d. Die ALP-Aktivität zeigt nach der Gabe von Testosteron im zeitlichen Verlauf eine signifikante Änderung des Aktivitätsindex.

Ergebnis der VA entspr. Abb. 13a + b Tab.9

Ergebnis I:

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	213.6666	5	42.7333	1.10
in.Gr.	6798.6666	7	971.2380	25.09
Rest	1354.3333	35	38.6952	
Summe	8366.6666	47		

Ergebnis II:

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	1215.9444	7	700.1194	3.39
in.Gr.	5299.4444	8	662.4305	3.21
Rest	11548.5555	56	206.2242	
Summe	18063.9444	71		

Ergebnis III:

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
C	3182.0119	1	3182.0119	33.98
B(C)	1123.4166	12	93.6180	
A	7870.1428	7	1124.3661	8.02
A C	2991.2738	7	427.3248	3.04
Rest	11773.5833	84	140.1617	
Summe	26940.4285	111		

Legende zu Ergebnis I:

Ergebnis der DVA nach Gabe von Actinomycin D und darauf-
folgender Gabe von Östradiol. Injektionsabstand = 6 h, n=
6, Beobachtungsdauer 3-6 d. Die Änderung der ALP-Aktivität
ist signifikant.

zu Ergebnis II:

Ergebnis der DVA nach Gabe von Actinomycin D und darauf-
folgender 2-maliger Gabe von Östradiol. Injektionsabstand
6 bzw. 24 h, n = 8, Beobachtungsdauer 3 - 6 d. Im zeitlichen
Verlauf ist die Änderung der ALB-Aktivität signifikant.

zu Ergebnis III:

Mit dem PHMdVA (partiell hierarchisches Modell der Varianz-
Analyse) wurden die beiden Kurvenverläufe auf Parallelität
geprüft. Es lässt sich im zeitlichen Verlauf beider Aktivitäts-
kurven keine Parallelität nachweisen.

Tabelle 1:

Verhalten der ALP-Aktivität bei unbehandelten Wistar-Ratten:

122809.00	781.00	5.00	156.20	12.78	14.28
111293.00	739.00	5.00	147.80	20.34	22.74
121595.00	777.00	5.00	155.40	13.03	14.56
126006.00	786.00	5.00	157.20	22.12	24.73
102050.00	706.00	5.00	141.20	21.73	24.30
140577.00	735.00	5.00	167.00	15.04	16.82
130242.00	802.00	5.00	160.40	17.89	20.00
125465.00	789.00	5.00	157.80	13.86	15.49
113401.00	749.00	5.00	149.80	14.49	17.32
122330.00	774.00	5.00	154.80	22.42	25.07

Tabelle-2:

Verhalten der ALP-Aktivität nach der Hypophysectomie, n = 15, Beobachtungsdauer p.Op = 20 d.

A:	476129.00	3743.00	30.00	124.76	17.44	17.73
	572541.00	4101.00	30.00	156.70	19.94	20.28
	273654.00	2014.00	15.00	154.26	14.69	15.21
	302732.00	2111.00	15.00	140.37	19.38	20.06
	378850.00	2374.00	15.00	158.26	14.43	14.93
	660938.00	3108.00	15.00	207.20	33.62	34.80
	854176.00	3564.00	15.00	237.60	22.16	22.94
	693296.00	3216.00	15.00	214.40	15.88	16.44
	636940.00	3084.00	15.00	205.60	13.83	14.31
	496856.00	2712.00	15.00	180.80	20.85	21.58
	357301.00	2307.00	15.00	153.00	12.86	13.31
	238780.00	1878.00	15.00	125.20	15.60	16.15
	170769.00	1571.00	15.00	107.73	20.38	21.09
	150880.00	1492.00	15.00	99.46	12.84	13.29
	149072.00	1480.00	15.00	98.66	14.24	14.74
	125000.00	1360.00	15.00	90.66	10.62	10.99
	139681.00	1489.00	15.00	93.06	8.33	8.60
	131209.00	1397.00	15.00	93.57	8.57	8.87
	109372.00	1278.00	15.00	85.20	5.96	5.89
	122082.00	1348.00	15.00	89.68	7.92	8.20
B:	52277.69	395.72	3.00	131.90	5.15	6.31
C:	85029.00	897.00	10.00	89.70	21.53	22.52

B=Mittelwerte der ALP-Aktivität präoperativ

C=Mittelwert der ALP-Aktivität von 10 hypophysectomierten Ratten Stamm prägnue-dawley

Legende zu Tab. 3: Verhalten der ALP-Aktivität nach Injektion von

A: 4 x 0,5 ml physiologischer NaCl

B: 4 x 0,5 ml öliges Lösungsmittel

n = 6, Beobachtungszeitraum 14 d post-injektion (p.i.)

A:	45928.00	524.00	6.00	87.33	5.24	5.75
	46372.00	526.00	6.00	87.66	6.57	7.20
	49132.00	542.00	6.00	90.33	5.34	5.85
	44664.00	516.00	6.00	86.00	6.92	7.58
	44208.00	512.00	6.00	85.00	9.28	10.17
	49961.00	547.00	6.00	91.16	3.93	4.31
	42424.00	500.00	6.00	83.33	11.23	12.30
	45740.00	522.00	6.00	87.00	7.37	8.07
	47820.00	534.00	6.00	89.00	7.00	7.66
	50736.00	548.00	6.00	91.33	10.68	11.70
	52060.00	554.00	6.00	92.33	12.29	13.47
	50332.00	546.00	6.00	91.00	10.37	11.36
	46308.00	526.00	6.00	87.66	5.70	6.25

B:	48637.00	539.00	6.00	89.83	6.01	6.58
	48038.00	536.00	6.00	89.33	5.08	5.57
	43633.00	511.00	6.00	85.16	4.33	4.75
	51287.00	553.00	6.00	92.16	7.29	7.98
	49630.00	544.00	6.00	90.66	7.15	7.84
	47525.00	533.00	6.00	88.83	5.42	5.94
	52520.00	560.00	6.00	93.33	6.49	7.11
	50333.00	549.00	6.00	91.50	4.07	4.46
	49884.00	546.00	6.00	91.00	5.74	6.29
	49377.00	543.00	6.00	90.50	6.26	6.86
	47825.00	535.00	6.00	89.16	4.48	4.91
	50556.00	550.00	6.00	91.66	4.82	5.28
	49196.00	542.00	6.00	90.33	6.26	6.86

Tabelle 4:

Legende zu Tab. 4: Verhalten der ALP-Aktivität nach 5 x 0,5 mg Orgastiptin s.c., n = 8,
Injektionsabstand = 12 h, Beobachtungsdauer p. i. = 9 d.

73789.00	767.00	8.00	95.87	5.62	6.01
75884.00	778.00	8.00	97.25	5.28	5.65
875496.00	1576.00	8.00	197.00	265.75	284.09
73596.00	766.00	8.00	95.75	5.60	5.99
81720.00	804.00	8.00	100.50	10.71	11.45
120916.00	982.00	8.00	122.75	6.85	7.32
150656.00	1096.00	8.00	137.00	7.93	8.48
169292.00	1162.00	8.00	145.25	7.99	8.54
169932.00	1162.00	8.00	145.25	11.99	12.82
172492.00	1174.00	8.00	146.75	5.09	5.44
137472.00	1048.00	8.00	131.00	4.79	5.12
125336.00	1000.00	8.00	125.00	6.48	6.92
96876.00	878.00	8.00	109.75	8.02	8.58
81436.00	802.00	8.00	100.25	11.37	12.16
73336.00	764.00	8.00	95.50	6.83	7.30
71728.00	756.00	8.00	94.50	5.97	6.39
76280.00	780.00	8.00	97.50	5.36	5.73

Tabelle 5:

Legende zu Tab. 5: Verhalten der ALP-Aktivität nach 3 x 0,5 mg Orgastiptin i.p., n = 8, Infektionsabstand = 24 h, Beobachtungsdauer p. l. = 7 d.

74340.00	770.00	8.00	96.25	5.33	5.70
75804.00	778.00	8.00	97.25	4.23	4.52
79520.00	796.00	8.00	99.50	6.30	6.73
62604.00	706.00	8.00	88.25	6.11	6.54
67484.00	786.00	8.00	98.00	6.04	6.58
86372.00	830.00	8.00	103.75	5.69	6.08
89901.00	847.00	8.00	105.87	5.30	5.66
103929.00	911.00	8.00	113.87	4.85	5.19
116940.00	966.00	8.00	120.75	6.07	6.49
1127888.00	1848.00	8.00	231.00	296.01	316.44
112668.00	948.00	8.00	118.50	6.61	7.07
152784.00	1104.00	8.00	138.00	7.34	7.85
111680.00	944.00	8.00	118.00	6.00	6.41
91976.00	856.00	8.00	107.00	6.92	7.40
83668.00	816.00	8.00	102.00	7.54	8.07
81612.00	806.00	8.00	100.75	7.13	7.62
71204.00	754.00	8.00	94.25	4.17	4.46
69996.00	746.00	8.00	93.25	7.34	7.85

Tabelle 6:

Legende zu Tab. 6: ALP-Index nach 3 x 0,5 mg 17- β -Östradiol, Injektionsabstand = 12 h,
n = 7, Beobachtungsdauer p. i. 14 d.

63468.00	666.00	7.00	95.14	3.83	4.14
66668.00	682.00	7.00	97.42	5.62	6.07
69780.00	698.00	7.00	99.71	5.06	5.46
89572.00	790.00	7.00	112.85	7.69	8.31
113032.00	888.00	7.00	126.85	7.39	7.98
123328.00	928.00	7.00	132.57	6.56	7.09
166217.00	1077.00	7.00	153.85	8.56	9.24
159116.00	1054.00	7.00	150.57	7.68	8.30
157504.00	1048.00	7.00	149.71	9.28	10.02
129425.00	951.00	7.00	135.85	5.66	6.12
127480.00	944.00	7.00	134.85	4.99	5.39
107896.00	868.00	7.00	124.00	6.14	6.63
90688.00	796.00	7.00	113.71	4.95	5.34
89835.00	791.00	7.00	113.00	8.03	8.67
81625.00	755.00	7.00	107.85	5.24	5.66
84221.00	767.00	7.00	109.57	5.06	5.47
84292.00	766.00	7.00	109.42	8.19	8.84
65584.00	676.00	7.00	96.57	6.56	7.09
62472.00	660.00	7.00	94.28	5.89	6.36
67096.00	684.00	7.00	97.71	6.08	6.57
60224.00	648.00	7.00	92.57	5.82	6.29
984140.00	1518.00	7.00	216.85	305.88	330.35
60200.00	648.00	7.00	92.57	5.52	5.96

Tabelle 7:

Legende zu Tab. 7: Verhalten der ALP-Aktivität nach 4 x 0,25 mg Progesteron s. c., n = 12, Injektionsabstand 24 h, Beobachtungsdauer p. i. = 15 d.

94012.00	1058.00	12.00	88.16	7.80	8.15
96980.00	1074.00	12.00	89.50	8.45	8.82
104480.00	1116.00	12.00	93.00	7.59	7.93
132632.00	1256.00	12.00	104.66	9.87	10.31
174364.00	1442.00	12.00	120.16	9.50	9.92
208860.00	1578.00	12.00	131.50	10.61	11.08
230061.00	1659.00	12.00	138.25	7.66	8.00
207568.00	1576.00	12.00	131.33	6.99	7.30
202108.00	1554.00	12.00	129.50	8.49	8.06
177028.00	1454.00	12.00	121.16	8.42	8.73
146017.00	1317.00	12.00	109.75	11.09	11.58
138704.00	1280.00	12.00	106.66	13.45	14.04
138500.00	1286.00	12.00	107.16	7.54	7.33
99068.00	1086.00	12.00	90.50	8.08	8.44
92952.00	1052.00	12.00	87.66	7.78	8.12

Tabelle 8:

Legende zu Tab. 8: Verhalten der ALP-Aktivität nach 4 x 0,5 mg Testosteron s.c., n = 6,
Injektionsabstand = 24 h, Beobachtungsdauer p. l. = 15 d.

45960.00	524.00	6.00	87.33	5.73	6.28
47172.00	530.00	6.00	88.33	7.69	8.43
46852.00	530.00	6.00	88.33	2.42	2.65
46320.00	524.00	6.00	87.33	9.63	10.55
36596.00	466.00	6.00	77.66	8.19	8.98
26684.00	398.00	6.00	66.33	6.87	7.52
29197.00	413.00	6.00	68.33	11.32	12.39
33788.00	446.00	6.00	74.33	10.29	11.27
41932.00	498.00	6.00	83.00	9.98	10.93
38752.00	480.00	6.00	80.00	7.65	8.39
47521.00	533.00	6.00	88.83	5.36	5.87
50912.00	552.00	6.00	92.00	4.61	5.05
53612.00	566.00	6.00	94.33	6.04	6.62
47408.00	532.00	6.00	88.66	6.29	6.89
44236.00	514.00	6.00	85.66	5.82	6.37

Tabelle 9:

Legende zu Tab. 9: V1 Verhalten der ALP nach Gabe von Actinomycin D und 2 x Östradiol,

n = 6, Injektionsabstand 6 u. 24 h, Beobachtungsdauer 6 d.

V2 Verhalten der ALP nach Gabe von Östradiol und Actinomycin D, n = 8, Injektionsabstand 6 h, Beobachtungsdauer 6 d.

V 1:						
45580.00	522.00	6.00	87.00	5.25	5.76	
46040.00	524.00	6.00	87.33	6.79	7.44	
42560.00	504.00	6.00	84.00	6.11	6.69	
31160.00	432.00	6.00	72.00	3.05	3.34	
27936.00	408.00	6.00	68.00	5.65	6.19	
25668.00	390.00	6.00	65.00	7.28	7.97	
21460.00	358.00	6.00	59.66	4.06	4.45	
17948.00	326.00	6.00	54.33	6.26	6.86	
V 2:						
57424.00	676.00	8.00	84.50	6.14	6.56	
55764.00	666.00	8.00	83.25	6.31	6.75	
63768.00	712.00	8.00	89.00	7.07	7.55	
53880.00	652.00	8.00	81.50	9.63	10.29	
77388.00	774.00	8.00	96.75	17.69	18.91	
60000.00	680.00	8.00	85.00	16.58	17.72	
47784.00	600.00	8.00	75.00	18.65	19.94	
39616.00	548.00	8.00	68.50	16.11	17.22	
40356.00	558.00	8.00	69.75	13.39	14.31	

Literaturverzeichnis

1. ALKER, R.I., HERION, J.L., PALMER, J.G.:
Leukocyte labeling with inorganic radiophosphorus.
Amer. J. Physiol. 202, 1137 (1961)
2. ALTER, A.A., S.L. LEE, M. POURFAR, G. DOBKIN:
Studies of Leukocyte Alkaline Phosphatase in Mongolism:
A Possible Chromosome Marker.
Blood, Vol. 22, 2 (1963), 165.
3. BAILER, P. : Hormonabhängiges Verhalten der ALP. Habilitationsschrift
JULU Giessen (1970).
4. BAUER-SIC, P.: Signifikante Veränderung des Alkalischen Leukocyten-
phosphatase-Index während des menstruellen Zyklus.
Acta Endocrinol. 52 (1966) , 130
5. BAXTER, M.F.: Leukocyte Alkaline Phosphatase. Hartford Hosp. Bull. Vo
23 (1968) 19.
6. BLUM, K.U.: Enzympathologie der Blutzellen . Blut 8 (1962), 239
7. BOLL, J.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen
Bedingungen. Exper. Medizin, Pathologie und Klinik, Bd. 17,
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1966).
8. BOTTE, V., S.S.KOIDE: Effect of Actinomycin D on the Induction of
Uterine Alkaline Phosphatase of Growing Rats by 17- α -Estradiol.
Separatum EXPERIENTIA, 24. 1024 (1968).
9. BRODELL, H., S.N. SWISHER: Studies of leukocyte alkaline phosphatase
determined by clinically applicable histochemical method.
Clin. Res. Proc. 2 (1954) 58.
10. EBADI, M., E.Mc. COY: Progesteron-Medicated Increases of Leukocyte
Alkaline Phosphatase in Rabbits.
Biochem. biophys. Acta (1966) 502.
11. EMMENS, C.W., L MARTIN: Anti-Estrogens in: Methods in Hormon Research
Vol. III, 81, Academic Press, New-York-London (1964).
12. GARREN, L.D., R.R. HOWELL, G.M. TOMKINS, R.M. CROCCO:
A paradoxical effect of Actinomycin D.
Proc. Nat. Acad. Sci. 52/4, 1121-1129 (1964).
13. GOODMAN, L.S., A. GILMAN: The Pharmacological Basis of Therapy
Springer New York.
14. GOODMAN, H.M.: Metabolic Effects of Actinomycin in Rats.
Soc.Exp.Biol.Med. v.126 821-824 (1967) (32579)

15. GOSH, N.K., W.H. FISHMAN: Characterization of placental isoenzyme of alkaline phosphatase in human pregnancy serum.
Canadian Jour. Biochem. Vol 47; N. 2 (1969).
16. FLURY, R., T. WEGMANN: Das Verhalten der ALP beim Morbus Hodgkin.
Schweiz. med. Wschr. 94 (1964) 958.
17. HAERING, M.: Das Verhalten der ALP in der Schwangerschaft, unter der Geburt und im Wochenbett.
Geburtsh. Gynäk. 2 (1964) 132.
18. HORN, R.G., S.S. SPICER and A.B. WEIZEL: Phagocytosis of bacteria by heterophil leukocytes.
Amer. f. Path. 45, 327 (1964).
19. JUNGBLUT, P.W.: Östradiol-Wirkung durch zweistufigen Vorgang gesteuert.
Medical Tribune, Jahrg. 5, Nr. 30 (1970).
20. KAPLOW, L.S. I. A. Histochemical Procedure for Localizing and Evaluating Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity in Smears of Blood and Marrow
Blood, Vol. X (1955) 1023.
II: Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase. Use of complex naphthol AS phosphates in azodye coupling techniques.
Amer. Journ. of Clin. Pathol. 39, 439 (1963)
III: Alkaline phosphatase in peripheral blood lymphocytes. Arch. Path. 88, 69 (1969).
21. KOCH, E., D. REMY: Die ALP in der Differentialdiagnose hämatologischer Erkrankungen.
Klin. Wschr. 1. (1960), 26.
22. LAMBERS, K.: Cytochemische Untersuchungen an Blutzellen und ihre Bedeutung für die Klinik der Blutkrankheiten.
Internist, 1, 269 (1960).
23. LEE, S.L., F. ROSNER, A.A. ALTER, F. SCHULTZ: Pathophysiology of Leukocyte Alkaline Phosphatase.
Congress of the Intern. Soc. of Haematology, Stockholm (1964) Abs. A39
24. LEVY, H.F.: Interferon and interferon inducers in the Treatment of Malignancies.
Arch. Intern. Med. Vol 126, 78-83 (1970)

25. MERKER, H. 1: Die alkalische Leukozytenphosphatase und ihre diagnostische Bedeutung.
Klin. Wschr. 38 (1960) 1228.
2. Grundlagen zur klinisch-morphologischen Blutdiagnostik mit Hydrolasen.
Zyto- und Histochemie in der Hämatologie.
Freiburger Symposion, Hsgb. H. Merker, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963).
3. L. HEILMEYER: Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukozyten.
Dtsch. med. Wschr. 85 (1960) 253.
26. MERKER: Cytochemie der Blutzellen in Hdbch. der Inn. Medizin
2. Band, Teil 1, 5. Aufl. Springer Berlin-Heidelberg-New York (1968).
27. PLENERT, W. Methodische Studien zur Zytochemie der Leukozytenphosphatasen.
1. Mitteilung: Einfluß von Fixierung und Metallionen auf die Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase in Blutaussstrichen.
Histochemie 1 (1959) 17.
2. Method. Studien zur s.o.
- II. Mitteilung: Der Einfluß einiger Hemmstoffe und verschiedener organischer Verbindungen auf die Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase.
Histochemie 1 (1959) 178.
- 3.: Studien zur Zytochemie der Leukozytenphosphatase im Kindesalter.
- I. Mitteilung: Die alkalische Granulocytenpoese. Methodische Grundlagen und Normalwerte.
Folia haemat. 79 (1962) 273.
4. III. Mitteilung: Die Beeinflussung der AGP-Aktivität und Steroidpräparate.
Folia haemat. 80 (1963) 52.
28. ROSNER, F., S.L. LEE: Endocrine Relationship of Leukocyte Alkaline Phosphatase. Blood Vol 25,3 (1965) 356.
29. RUBINI, J.R.: A role for alkaline phosphatase in controlling DNA synthesis.
J. clin. Invest. 42, 974 (1963)

30. SPICER, S.S. HARDIN, J.H.: Ultrastructure, cytochemistry and function of neutrophil Leukocyte granules. *Laborat. Invest* 20 (1969) 488.
31. SRAMKOVA, L. E.PROCHAZKOVA, M. NOVAK: Alkalische Leukozytenphosphatase bei Meningitis und Meningoencephalitis. *Med. Klin.* 64 (1969) 1748.
32. STOBBE, H., P. NEUMANN: Die alkalische Granulozytenphosphatase bei Polycythaemia vera. *Z. ges. inn. Med.* 18 (1963) 925.
33. SCHÄFER, H.E., R. FISCHER: Östrogenbedingte Induktion der Alkalischen Phosphatase in Fibroblasten des subcutanen Bindegewebes der Maus. *Acta Endocrinologica* 57 (1968) 261-'273.
34. SCHMIDT, G.: Nonspecific Acid Phosphomonoesterases
P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbeck.
The Enzymes, Vol. V. S. 37, Academic Press. New York-London (1961).
35. THORELL, B.: Studies of the formation of cellular substances during blood cell production.
London. H. Kimpton (1947).
36. TOMPKINS, G.M., E.B. THOMPSON, S. HAYASHI, T. GELERTER, D. GRANNER, B. PETERKOFKY: Tyrosine Transaminase Induction in Mammalian Cells in Tissue Culture.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (1966) in press.
37. TOMPKINS, G.M. B. PETERKOFKY: Effekt of Inhibitors of Nucleic Acid Synthesis on Steroid-mediated Induction of Tyrosine Amino-transferase in Hepatoma Cell Cultures
J. Med. Biol. 30 (1967) 49-61
38. TRUBOWITZ, S., D. KIRMAN, B. MASEK: The leukocyte alkaline phosphatase in mongolism.
Lancet 2, 486 (1962).
39. TRUBOWITZ, S., D. FELDMANN, C. BENANTE, V.R. HUNT:
The alkaline phosphatase content of the human polymorphonuclear leukocyte in blood and marrow.
Amer. J. Clin. Path. 31, 481 (1959).

40. VALENTINE, W.N., W.S. BECK: Biochemical Studies On Leucocytes
I. Phosphatase Activity in Health, Leucocytosis and Myelocytic
Leucemia.
J. Lab. Clin. Med. Vol 38 (1951) 39.
41. VALENTINE, W.N., J.H. FOLLETTE, E.B. HARDIN, W.S. BECK, J.S.
LAWRENCE: Studies on Leukocyte Alkaline Phosphatase. Activity
Relation to "Stress" and Pituitary. Adrenal Activity.
J. Lab. clin. Med. Vol 44 (1954) 219.
42. VALENTINE, W.N.: The Enzymes of Leukocytes. Ann. New York Acad.Sci.
59 (1955) 1003.
43. VANNOTTI, A.: Die enzymatische Aktivität der Leukozyten in der
menschlichen Physiopathologie und die klinische Bedeutung der
biochemisch-analytischen und zellchemischen Nachweismethoden.
Zyto- und Histochemie in der Hämatologie.
9. Freiburger Symposion, Hsgb. H. Merker, Springer Berlin-Göttingen,
Heidelberg (1963).
44. WACHSTEIN, M.: Alkaline Phosphatase activity in normal and abnormal
blood and marrow smears.
J. Lab. clin. Med. Vol 31 (1946) 1.
45. WATERS, M.D. G.K. SUMMER: Regulation of Alkaline Phosphatase in
Human Skin Fibroblasts (34596)
Soc. Exp. Biol. and Med. Vol 133, N. 3, 926-930.
46. WEISSEL, M.: Die alkalische Leukozytenphosphatase.
II. Mitteilung: Das Verhalten der alkalischen L. bei verschiedenen
Krankheiten.
Z. ges. inn. Med. 13 (1963) 577.
47. WEISSEL, M., D.LOHMANN: Der Einfluß des Blutplasmas auf die
alkalische Leukozytenphosphatase.
Z. ges. inn. Med. 9 (1964) 397
48. WEBER, J.: Das Verhalten der alkal. L. des Kaninchens unter dem Ein-
fluß von Actinomycin D und Puromycin.
Imangural-Dissertation der Med. Fak. der JLU Giessen (1970)

49. WEBER, J.: Das Verhalten der alkal. L. des Kaninchens unter dem Einfluß von Actinomycin D und Puromycin.
Imangural-Dissertation der Med. Fak. der JLU Gießen (1970).
50. WENDT, F., C. BUDDE: Das Verhalten der alkal. L. während der Initialphase der Fieberreaktion nach Injektion von bakteriellem Endotoxin und endogenem Pyrogen beim Menschen.
Folia haemat. N.F. 6 (1961) 149.
51. WILTSHAW, E., W.C. MOLONEY: Studies on various factors influencing leukocyte and phosphatase activity.
J. Lab. clin. Med. 47 (1956) 691.
52. Y ABUL-FADL, R.B. SCOTT: Effect of Estrogen and Progesteron on Leukocyte glycogen and Alkaline Phosphatase in Dogs.
Proc. Sec. exp. Biol. Med. Vol 132 (1969) 193 - 194.

Lebenslauf

Am 3. Juli 1945 wurde ich als Sohn des Dr. med. Fritz Schröder und seiner Ehefrau Ruth, geborene Görlach, in Bad Salzschlirf geboren.

1951 - 1955 Besuch der Grundschule in Lauterbach.

1955 - 1964 Besuch des neusprachlichen Gymnasiums in Lauterbach.

Februar 1964 Abitur.

März 1964 - März 1966 Wehrdienst, Entlassung als Leutnant der Reserve.

Sommersemester 1966 - Wintersemester 1971/72 als Student der Medizin an der Justus Liebig-Universität immatrikuliert.

Wintersemester 1968 ärztliche Vorprüfung.

11. 2. 1972 Staatsexamen.

12 Monate Tätigkeit als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus Schotten, an der Medizinischen Klinik und dem Anatomischen Institut der Universität.

Mai 1973 Approbation als Arzt.

Seit September 1973 als wissenschaftlicher Assistent an der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Giessen beschäftigt.

Wissenschaftliche Interessen: Ultrastrukturelle Forschung: Histochemie, Elektronenmikroskopie

Abgeschlossene wissenschaftliche Arbeiten:

Österreichische Arbeitsgemeinschaft für Ultrastrukturforschung

Deutsche Gesellschaft für Elektronenmikroskopie

gemeins. Tagung Wien 1969 Lange R. und R. Schröder

Vortrag E 5 Bd. 126 (1970)

Verhandlung der Anatomischen Gesellschaft

Homburg (Saar) 1969 R. Lange und R. Schröder

Perfusionsfixierung des Pankreas mit verschiedenen

Flüssigkeiten bei Fröschen. 126, 425 - 427

Deutsche Medizinische Wochenschrift Nr. 52, 2612

W. Krause, R. Schröder, E. Wulff - 2617 1970

Ungewöhnlicher Verlauf einer Intoxikation durch
Schädlingsbekämpfungsmittel (Detmol-Konzentrat VAP)

Plasmazelleinschlüsse bei Saure Maltrase Defekt
(Glykogenose II) H. Löffler, L. Pralle und R. Schröder

in: Klinische Wochenschrift im Druck

Acta Hämatologica in Vorbereitung.

Histochemische Untersuchungen am Insulinmolekül nach
fraktionierter Spaltung der S-S Brücken mit dem metachro-
matisch wirksamen Pseudoisocyanin an plastikeingebetteten
Pankreasschnitten

in: Histochemie in Vorbereitung

Giessen, den 10. 1. 1974

Danksagung

für die Überlassung des Themas danke ich

Prof. Dr. Helmut Löffler, Med. Univ. Klinik Giessen,

für die Beratung bei der statistischen Auswertung
danke ich W. Höbel, Institut für Dokumentation und
Statistik,

für die freundliche Hilfe bei der Beschaffung von
Testsubstanzen und bei der Hypophysektomie danke ich
der Firma Schering AG Berlin.

